

# Técnicas Usadas em Moderna Biotecnologia

TRAINING COURSE ON  
RISK ASSESSMENT

**Dr. Gutemberg D. Sousa**

PhD. Biotecnologia/USP  
Professor Faculdade Anhanguera de Brasília  
Analista de C&T – CTNBio/MCTIC

# Agenda



- Conceptos importantes
- Mejoramiento convencional x Moderna biotecnología
- Métodos de transformación
- Agrobacterium y biobalística
- Ingeniería genética de precisión

# Conceptos importantes



uso de técnicas in vitro de ácido nucleico, mediante la inserción, eliminación o modificación de un gen o una secuencia de ADN/ARN en un organismo receptor o parental.

modificación directa de los genes de un organismo

El Protocolo de Cartagena hace hincapié en la naturaleza “viva” del organismo y algunas de sus disposiciones también se aplican a materiales procesados que tienen su origen en OVM, que contengan combinaciones nuevas detectables de material genético replicable que se hayan obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna

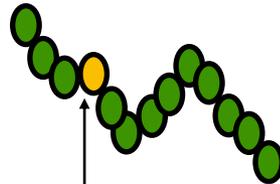
**OVM también se pueden producir mediante la fusión celular, cuando células de dos organismos diferentes que no pertenecen a la misma familia taxonómica se fusionan dando lugar a un organismo que contiene la información genética de ambas células parentales**

# Mejoramiento Convencional x Moderna Biotecnología

## Técnicas Tradicionales

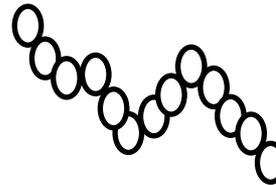
Transferência de un pool gênico

Donador



Gen de Interés

Receptor



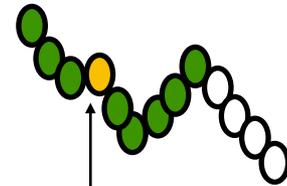
x

(cruza)

=

Organismo mejorado

(Algunso genes son transferidos)



Gene de interés

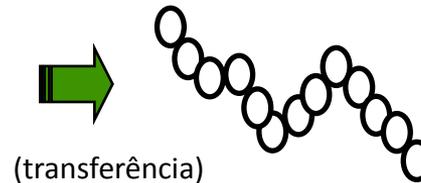
## Moderna Biotecnología

Adición de un único constructo

Gen de interés



Receptor

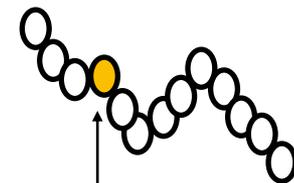


(transferência)

=

Organismo mejorado

(solamente transf. constructo)



Gen de interés

**Gamma Field for  
radiation  
breeding**

**100m radius**

**89 TBq  
Co-60 source  
at the center  
Shielding dike  
8m high**

**Institute of Radiation Breeding  
Ibaraki-ken, JAPAN  
<http://www.irb.affrc.go.jp/>**



# Triticale – nueva planta "sintética"



**X**



Cruzas



**Rescate de  
embriones y  
mutagénesis  
química**

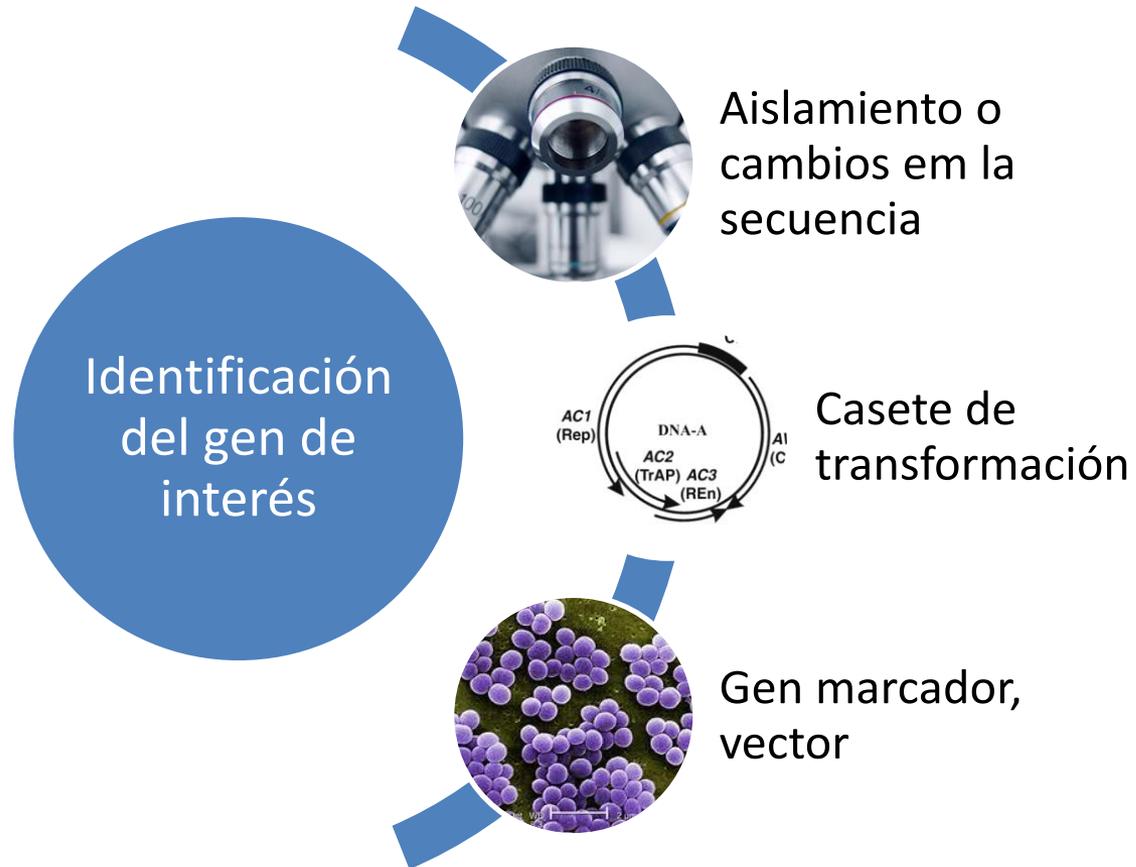


*Triticum turgidum*

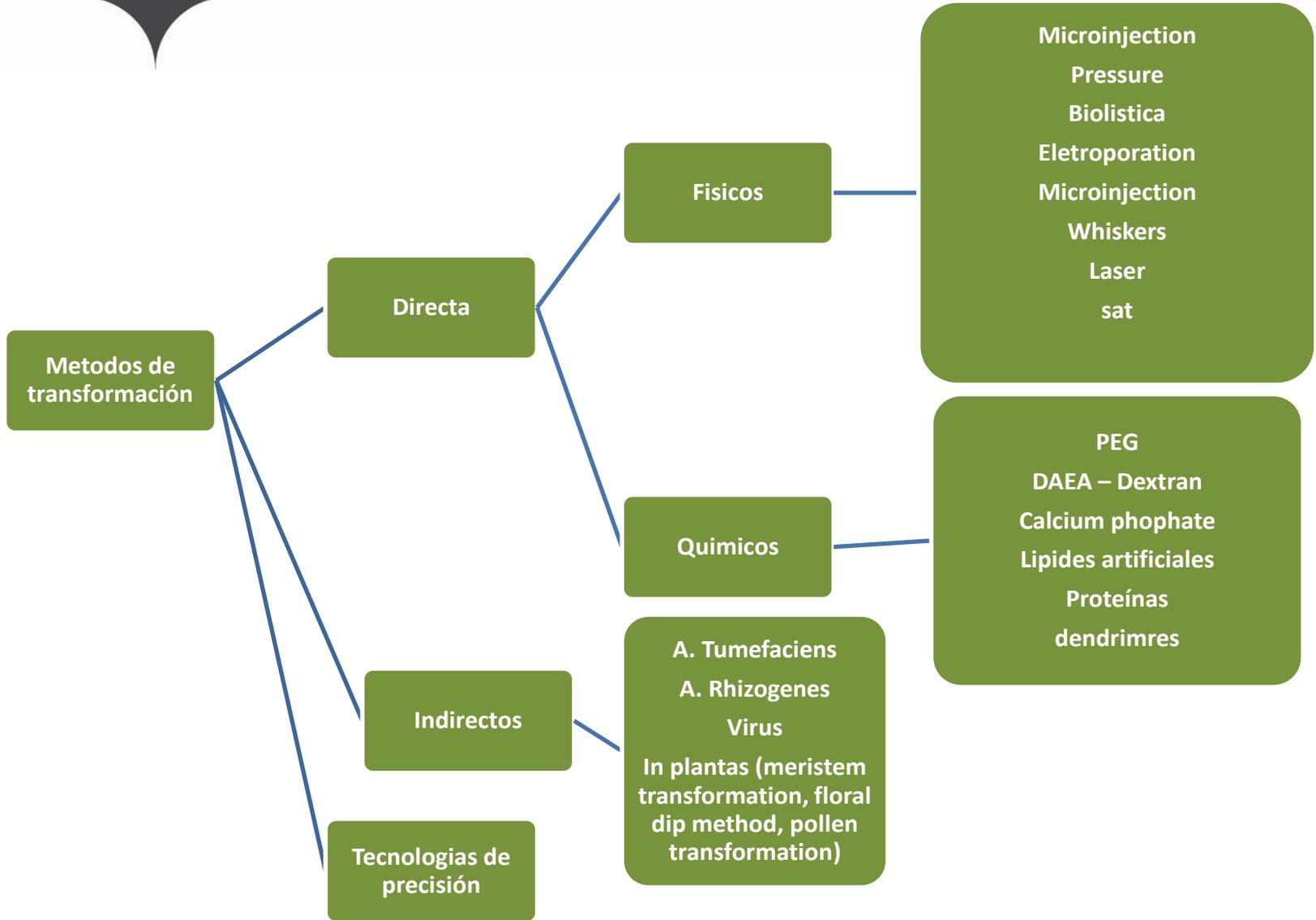
*Secale cereale*

**triticale**

# Métodos comúnmente utilizados en la modificación genética -Moderna biotecnología-



# Metodos de transformación



# Métodos comúnmente utilizados en la modificación genética

## - Casete -



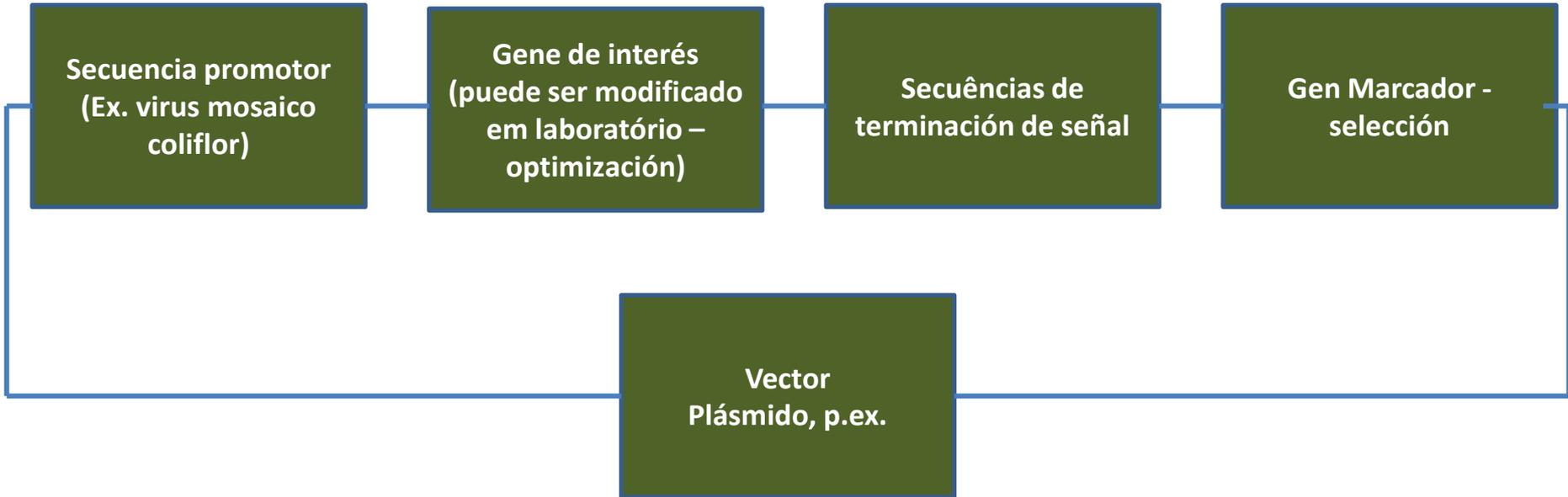
Secuencia promotor  
(Ex. virus mosaico  
coliflor)

Gene de interés  
(puede ser modificado  
en laboratorio –  
optimización)

Secuencias de  
terminación de señal

Gen Marcador -  
selección

Vector  
Plásmido, p.ex.



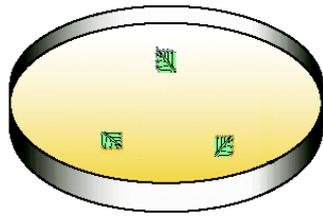
*Métodos comúnmente utilizados en la modificación genética*  
*- Casete -*



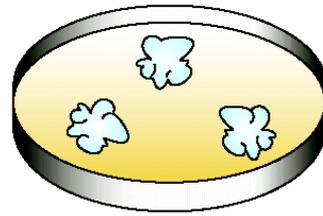
- Los casetes de transformación se integran en el genoma del organismo receptor mediante un proceso conocido como transformación
- Esto se puede llevar a cabo a través de distintos métodos, como la infección, utilizando *Agrobacterium*, el bombardeo de partículas o la microinyección

# Cultura de tejidos vegetales

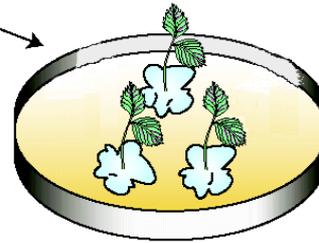
## Un requisito para el desarrollo de transgénico



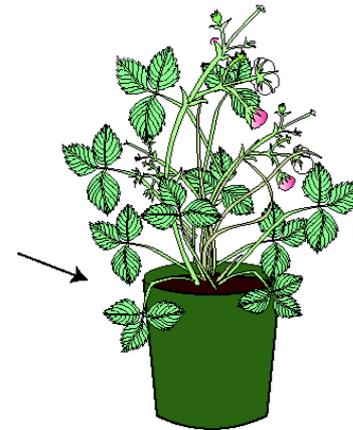
**Una parte de la  
Planta es  
cultivada**



**Crecimiento  
De  
callos**



**desarrollo**



**Los brotes están enraizados;  
la planta crece hasta la madurez**

# *Agrobacterium*

## *Un sistema de natural de transformación*



- **Un patógeno vegetal encontrado en la naturaleza**
- **Infecta muchas especies de plantas**
- **Entrega ADN que codifica hormonas vegetales**
- **El ADN se incorpora al cromosoma de la planta**
- **Genes hormonales expresados y forma de agallas en el sitio de infección**

# Causal agent of crown gall disease

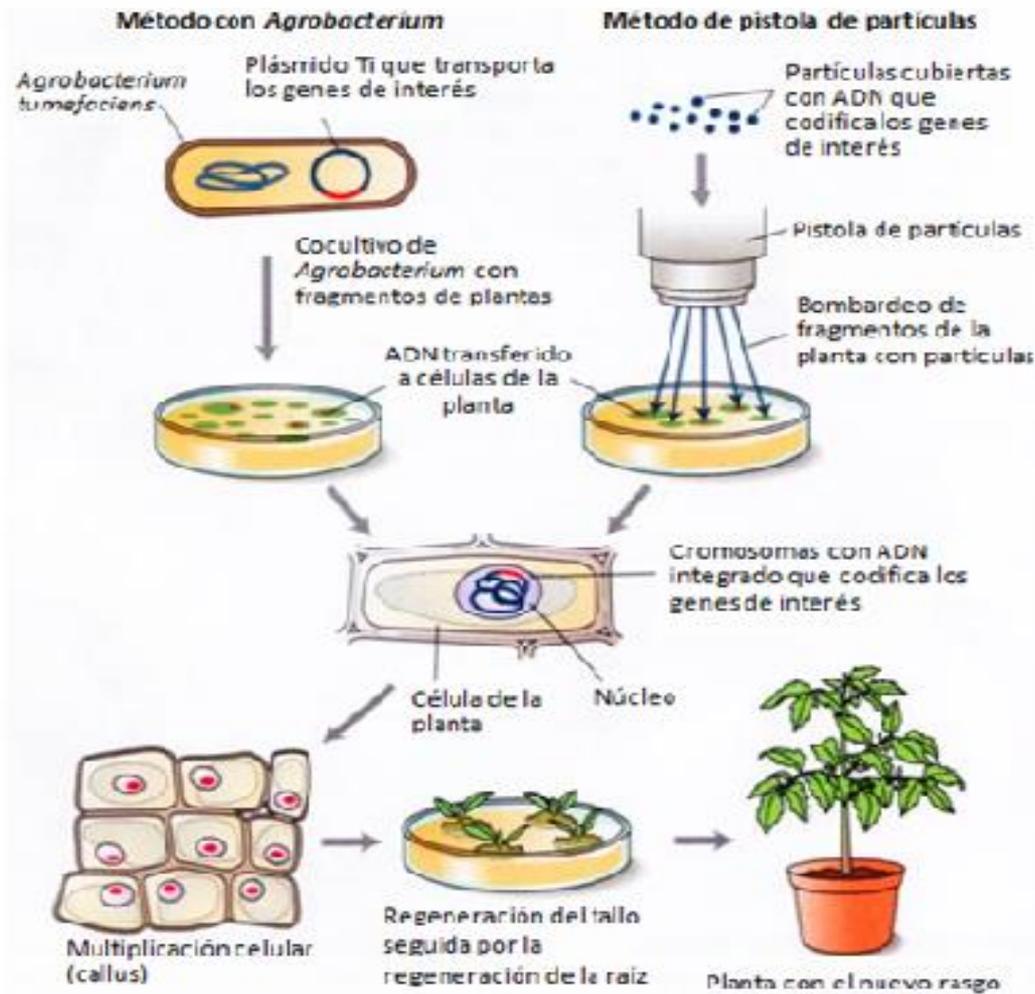


[microbewiki.kenyon.edu/index.php/Agrobacterium](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Agrobacterium)



<http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubcd/images/B1286-17.jpg>

# Integración



## Características del sistema Agrobacterium

**Los tejidos infectados no pueden ser regenerados  
(a través del cultivo de tejidos)  
en nuevas plantas**

### **¿Por qué?**

- fitohormona balancea la regeneración incorrecta

### **¿Solución?** ADN transferido (ADN-T) modificado por

- Eliminando genes de fitohormona
- Retener secuencias de transferencia esenciales
- Agregar sitio de clonación para gen de interés

# Biolística



- **El vector de ADN se recubre con partículas de oro o tungsteno**
- **Las partículas son aceleradas a altas velocidades por el arma**
- **Las partículas entran en el tejido de la planta**
- **El ADN ingresa al núcleo y**
- **se incorpora al cromosoma**



# Pasos de transformación

## Preparar el tejido para la transformación

- **El tejido debe ser capaz de convertirse en plantas normales**
- **Hoja, semilla en germinación, embriones inmaduros**

## Introduce DNA

- ***Agrobacterium* o biolística (gene gun)**

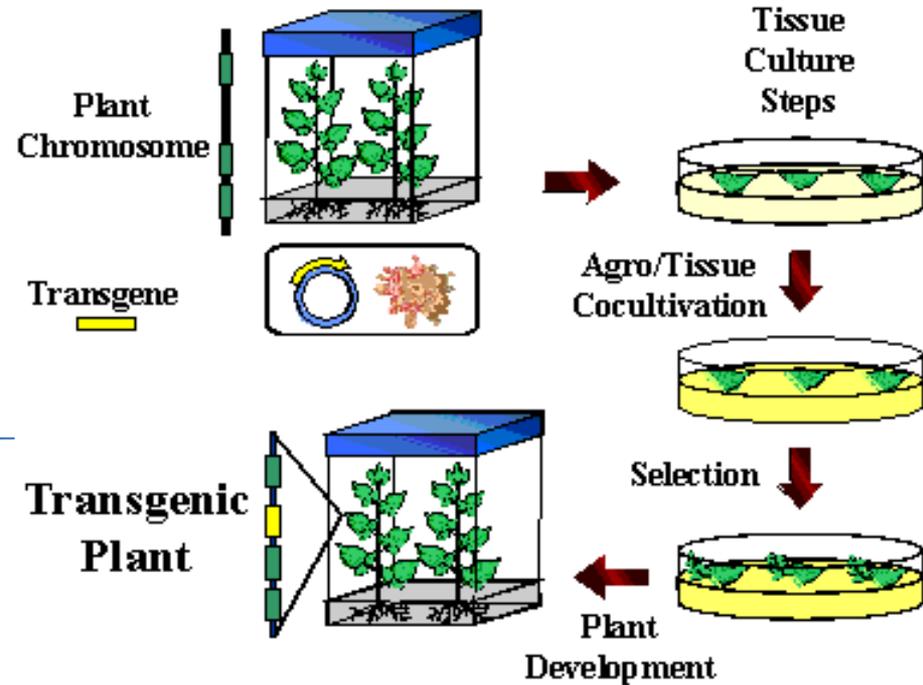
## Tejido vegetal de cultivo

- **Desarrollar brotes**
- **Rootear los brotes**

## Ensayos en campo

- **Varios sitios, varios años**

# Los pasos de laboratorio



# Ingeniería genética de precisión



**Edición  
Genómica**

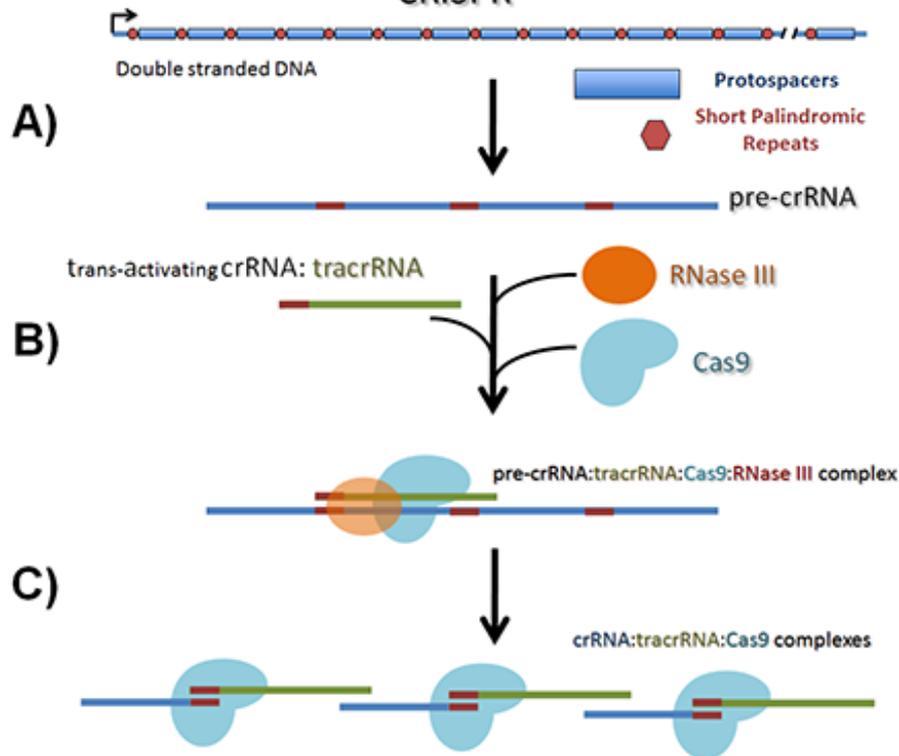


# ¿Qué es CRISPR?

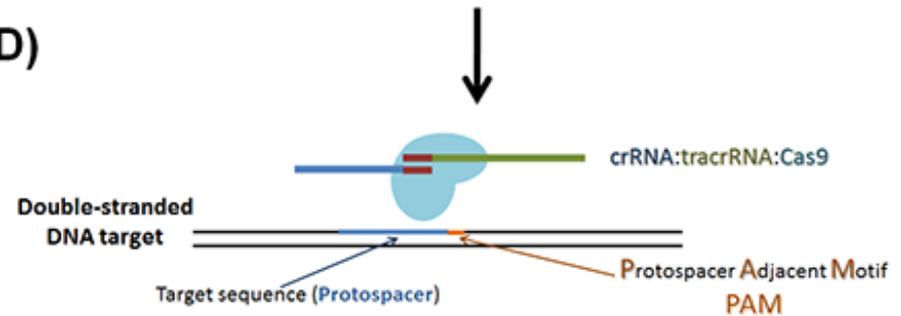


Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Array:

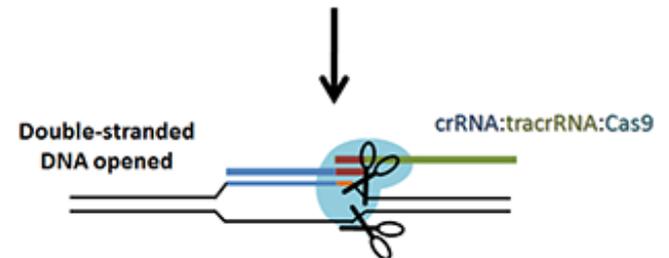
CRISPR



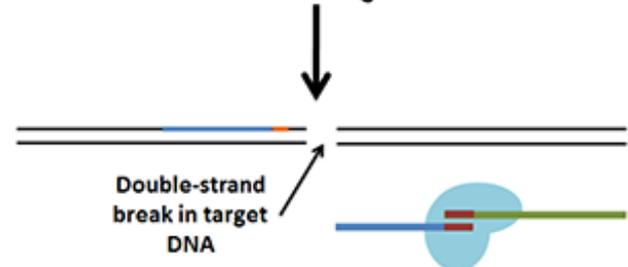
**D)**



**E)**



**F)**



# Conclusión

- Existen diferentes sistemas de entrega de ácidos nucleicos
- En particular, la mayoría de los transgénicos en situación de comercio fueron transformados por sistema agrobacterium o biobalística.
- En estos sistemas, la integración del casete es aleatoria, pero fácilmente mapeable.
- Los nuevos enfoques para la modificación de las plantas (precisión) ya son realidades

The background of the slide is a monochromatic blue image of palm trees. The trunks of the palm trees are in the foreground, appearing as dark, textured vertical lines. The fronds of the palm trees are visible in the background, creating a layered, tropical scene. The overall tone is serene and celebratory.

**¡Muchas gracias!  
Obrigado!!!!**